Plant Pathology Bulletin 18: 35-44, 2009

利用細菌表現康乃馨斑駁病毒之鞘蛋白製備多元抗體及其檢測應用

陳金枝[1]　鄭櫻慧[1]　黃春惠[1]　江芬蘭[1]　陳麗雯[1]　張清安[2, 3]

[1.] 台中縣行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[2.] 台中縣霧峰鄉朝陽科技大學生化科技研究所

[3.] 聯絡作者，電子郵件：cachang@cyut.edu.tw；傳真：+886-4-2333-1089

接受日期：中華民國 97 年 12 月 22 日

摘　要

陳金枝、鄭櫻慧、黃春惠、江芬蘭、陳麗雯、張清安. 2009. 利用細菌表現康乃馨斑駁病毒之鞘蛋白製備多元抗體及其檢測應用. 植病會刊 18: 35-44.

彩色海芋爲我國近年新興之花卉，其切花產品有外銷日本市場之實績，極具經濟發展潛力。本研究由進口自紐西蘭的海芋種球 (Fandango 品系) 上，發現部分植株在首次抽生之葉片上出現黃色斑點癥狀，類似前人所報告之康乃馨斑駁病毒 (*Carnation mottle virus*, CarMV) 感染之病徵。因此抽取樣品之全量核酸，以包含全長度 CarMV 鞘蛋白基因所設計之簡併式引子對 CarMV-u/5' - CAACACATTTCRATWA-3' 和 CarMV-d/5' -TCACATCCT ATAAACA 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) ，獲得一大小約 1.0 kb 與預估值相符合的核酸片段。此核酸產物經選殖及定序後，所得之Fo25選殖株，其核苷酸及胺基酸序列與 GenBank 上已登錄之 CarMV 之鞘蛋白基因相同度 (identities) 均大於 96%，證實 Fo25 確爲 CarMV 的一個分離株。進一步比對分離自康乃馨與海芋之各種 CarMV 分離株，發現其鞘蛋白基因之核苷酸及胺基酸序列間相同度均高於 96%。而類緣分析結果則顯示 CarMV 之不同分離株似有依寄主之不同而形成不同群組之趨勢。依據所獲之 Fo25 核苷酸序列，設計可增幅其全長度鞘蛋白基因之專一性引子對，經PCR增幅後將其選殖於表現載體pET28b(+)上，再轉型於 *E. coli Rosetta* (DE3) 宿主內以誘導其大量生成 39 kDa 之表現蛋白，經免疫分析證實此表現蛋白可與購自 Agdia 公司 (Elkhart, Indiana, USA) 之 CarMV 抗體反應，確實具有 CarMV 鞘蛋白之抗原性。將此表現蛋白經兔免疫注射後，得到對應 CarMV-Fo25 抗血清。此抗血清可應用於 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)、西方轉漬法 (Western blotting)，及 SDS 免疫擴散反應 (Sodium dodecyl sulfate immunodiffusion) 與同源抗原產生強烈專一性反應。且於應用在 ELISA 進行田間樣品檢測時，其反應性 (reactivities) 穩定高於購自 Agdia 之對照抗體，並且可同時檢測出感染 CarMV 之海芋及康乃馨樣品，而對照之 Agdia 抗體則僅與康乃馨樣品有反應。此一抗體之成功製備對我國進口花卉種球或種苗之 CarMV 病毒監測將有實質之助益。

關鍵詞：康乃馨、海芋、康乃馨斑駁病毒、病毒檢測、細菌表現鞘蛋白

緒　言

海芋爲天南星科 (Araceae)、馬蹄蓮屬 (*Zantedeschia*) 之球根花卉，原產於非洲中南部地區[18)]。於歐、美及紐西蘭均已有百年多之栽培歷史，但近十餘年來由於育種技術之精進，新品種不斷推陳出新，受到消費者之矚目，而逐漸發展成爲現今經濟規模之新興產業。我國近年來也對於海芋品種之選育、組織培養之量產、栽培技術改進及外銷保鮮等技術均有突

破性的進展，加上本地之氣候適宜，彩色海芋之產業擴張快速[21]。

目前已知感染海芋之病毒種類包括絲狀病毒的 *Potyvirus* 屬病毒，如 *Dasheen mosaic virus* (DsMV)[28, 29]、*Turnip mosaic virus* (TuMV)[3]、*Zantedeschia mild mosaic virus* (ZaMMV)[13, 17]、Calla lily latent virus (CLLV)[6, 7]、*Konjak mosaic virus* (KoMV)[16, 23]、及 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)[23]；球型病毒包括三種 tospoviruses，如 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)[29] 和 *Calla lily chlorotic spot virus* (CCSV)[4] 及 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV)[8]，其他尚有 *Carmovirus* 屬之 *Carnation mottle virus* (CarMV)[10, 11]，*Cucumovirus* 屬之 *Cucumber mosaic virus* (CMV)[29] 以及 *Tombusvirus* 屬之 *Lisanthus necrosis virus* (LNV)[9] 等。

康乃馨斑駁病毒 (CarMV) 為 *Tombusviridae* 科 *Carmovirus* 屬之代表種病毒[15]，病毒顆粒體為球形，為康乃馨上最常見的病毒，且廣泛分佈於全球各地。大部分的康乃馨栽培種感染此病毒時並不會有病徵表現，少數栽培種感染時會在葉片出現黃化、斑駁病徵，造成花朵的品質及產量之降低。CarMV 具有高度傳播性，可經由嫁接、植物間相互接觸及人為操作等方式傳佈[15]。本病毒目前並無媒介昆蟲或種子傳播之記錄。

2003年陳慶忠等首次於北斗地區栽培之海芋植株上發現被 CarMV 感染之植株，其葉片呈現黃化斑駁病徵[10]，後續對該病毒之分離純化、寄主範圍、理化性質及病毒顆粒之型態觀察等亦有詳盡之報導[11]。

本研究由進口自紐西蘭之海芋種球上發現部分植株在首次抽生之葉片上呈現類似陳等所報導之黃色斑點病徵，經增幅選殖後證實該等植株確實含有 CarMV 之鞘蛋白基因分子訊號。吾等進一步以細菌誘導大量表現病毒鞘蛋白之技術，獲得純化免疫抗原經兔免疫注射製備 CarMV 抗血清，證明此抗血清除可應用於田間海芋之檢測外，也可擴及感染康乃馨之 CarMV 檢測，故具有應用於進口花卉種苗 CarMV 病毒監測之效果。本研究也進一步分析 CarMV 分離株之演化類緣關係，發現不同寄主來源之 CarMV 分離株有形成個別群組之趨勢。

材料與方法

病毒來源與保存

本研究由進口自紐西蘭之海芋種球 (Fandango 品種) 所初次抽生之葉片上，發現部分植株出現斑色斑點病徵，選取此等葉片組織與市售 CarMV 抗體 (Agdia Inc. Elkhart, Indiana, USA.)，進行 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 反應，選取呈現正反應之葉片組織，浸漬於 50% (v/v) 甘油中，保存於 -20℃ 下供後續實驗所需。

寄主接種試驗

分別切取呈現病斑之海芋及康乃馨葉片組織以 0.05M 磷酸緩衝溶液研磨後接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*)、紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、番杏 (*Tetragonia expansa*)、菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 及海芋 (*Zantedeschia* spp. BM varity) 等寄主植物，7 至 10 天後觀察是否有病徵表現，並摘取葉片組織以 CarMV 抗血清進行ELISA 檢測。

反轉錄 - 聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription - polymerase chain reaction, RT-PCR)

秤取 0.1 公克之海芋葉片，利用植物全量核酸純化試劑組 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 進行全量RNA之純化。以純化所得之 RNA 為模板，利用自行設計而可增幅 CarMV 全長度鞘蛋白 (coat protein, CP) 基因的簡併式引子對 CarMV-u/CarMV-d (5'-CAACACATTTCRATWA-3'/5'-TCACATCCTATAAACA-3') 進行 RT-PCR。依據單步驟 RT-PCR 試劑組 (Genemark Co., Taichung, Taiwan) 之配方，於每一 50 μl 反應液中分別加入 2 μl 全量 RNA、5 μl 5x PCR buffer、5 μl enhancer buffer、23 μl RNase free water、1U Reverse transcription polymerase、及各 2.5 μl 之 20 μM CarMV-u 和 CarMV-d 引子，於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中，設定反應程序為 50℃ 下進行反轉錄 30 分鐘，94℃ 變性 1 分鐘半；之後進行 28 個 PCR 循環反應：94℃ 下變性 1 分鐘半，50℃ 下煉合 1 分鐘半，72℃ 下聚合 2 分鐘，最後一個循環之 72℃ 聚合反應延長為 6 分鐘。此一反應預估可增幅出大小約 1.0 kbp 之核酸產物，反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME USA) 進行分析。

核酸片段選殖和核甘酸序列分析

將 RT-PCR 增幅所得之 1.0 kbp DNA 片段選殖於 TOPO TA-PCRII 載體上 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)，再篩選出含有 1.0 kbp DNA 之嵌入序列 (insert sequence) 選殖株送交明欣生物技術有限公司，以自動核酸定序儀分析其核甘酸序列，所得之序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc. Wesconsin, USA) 分析軟體進

行分析，並與GenBank 上已登錄之CarMV 分離株之鞘蛋白基因序列進行比對。

CarMV 鞘蛋白基因之蛋白質表現及多元抗體製備

以 CarMV-Fo25 分離株，設計對應其全長度鞘蛋白核甘酸序列之專一性引子對 CarCP-u/CarCP-d (5'-TTCGATAAGTACACCCCATGGAAAA, 劃底線者爲 *NcoI* 切位 /5'-TGATCGCTCGAGCATCCTATAAACAA-3', 劃雙底線者爲 *XhoI* 切位)。以感染 CarMV-Fo25 之海芋全量 RNA 爲模板進行 RT-PCR 反應，於 50℃ 下煉合，25 個循環增幅鞘蛋白基因 1044 bp。將增幅所得之 CarMV 鞘蛋白核酸以 *NcoI* 和 *XhoI* 切割，剪接於同樣經 *NcoI* 和 *XhoI* 切割之 pET28b (+) 載體 (Novagen, Inc. Madison, WI, USA)，並轉型於 *E. coli* strain Rosetta (DE3)。轉型株以 M9 培養基[20] 培養，並以 1 mg/ml 之 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現，菌液以 8000 rpm 轉速離心 10 分鐘後，以 pH 8.0 之 Tris-EDTA 緩衝液溶解沉澱物，收集蛋白質進行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳分析[19]，並經西方轉漬法以市售之 CarMV 抗體確認 CarMV 鞘蛋白之表現。進一步選用確定有鞘蛋白表現之選殖株進行大量表現蛋白之生產，方法乃參照以往之研究報告[5, 20]。以純化所得之表現蛋白進行每週一次，連續四週之兔免疫注射，每次注射 1 mg 之表現蛋白，第五週起由兔耳朵進行靜脈採血，每次採約30-40 ml 以製備多元抗體。

ELISA 及 SDS- 免疫擴散反應

1. ELISA (Enzyme-linked immuno-sorbent assay)

本試驗參照以往之研究報告進行[1, 12]，取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 ml 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入EIA反應盤內，每樣品二個重複，置於37℃ 生長箱 4 小時進行覆膜反應 (coating reaction) ；然後以 1x PBST 緩衝液沖洗三次；其次分別加入 Agdia 公司出品及本研究由表現蛋白製備之 CarMV 抗體後，放置在25℃ 定溫箱反應 4 小時；爾後以 1x PBST 緩衝液沖洗三次，再加入已稀釋 6,000 倍之山羊抗兔二次抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA) , 100 μl / 孔，置於 25℃ 之定溫箱反應 4 小時；最後再以 1x PBST 緩衝液沖洗四次後，再以150 μl/孔之比例加入濃度爲1mg/ml之鹼性磷酸酶基質 (p-NPP, Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) 進行呈色反應。反應後 20 至 30 分鐘，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作爲評估病毒濃度高低之依據。樣品讀值大於健康葉片讀值 2倍者，視爲正反應。

2. SDS-免疫擴散反應

將海芋及康乃馨病組織研磨液及細菌大量表現之 CarMV-Fo25 鞘蛋白，分別與一次水及 3% SDS 以等體積比例混合 (1:1:1) 後，取其濾液於沸水中悶 3 分鐘，作爲 SDS 處理過之抗原，再與自製之 CarMV-Fo25 抗血清進行 SDS- 免疫擴散反應[24]。

西方轉漬法 (Western blotting)

取 0.1 g 之罹病葉組織，以液態氮磨碎後，加入 200 μl 之樣品處理液 (50 mM Tris-HCl,10 mM KCl,10 mM MgCl2,1mM EDTA, 20% glycerol, 2% SDS, 3% β-Mercaptoethanol) ，取 100 μl 研磨液加入等體積之 LDS 溶液[19] 混勻。處理後之樣品經 SDS-PAGE 電泳後，取膠體將其轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，之後分別以自製之 CarMV-Fo25 及購自 Agdia 公司之 CarMV 抗血清進行反應。以細菌表現之 CarMV-Fo25 蛋白作爲正反應對照。

CarMV抗體應用於康乃馨罹病株之檢測及病毒之鞘蛋白核酸選殖

以進口自義大利及荷蘭之康乃馨幼苗爲樣品，採其葉片以本研究所製備之 CarMV 抗體分別以 ELISA、SDS 免疫擴散反應及西方轉漬法進行檢測，流程如前述。取與 CarMV 抗體產生正反應值之樣品，以植物全量 RNA 純化試劑組 (Qiagen, Hilden, Germany) 萃取其全量 RNA，以前述之 CarMV 鞘蛋白簡併式引子對 CarMV-u/CarMV-d 進行鞘蛋白核酸序列之選殖及定序，所得之核酸序列進一步與表一所列之 CarMV 分離株進行核酸相同度之分析

不同 CarMV 分離株之類緣關係分析

依據病毒鞘蛋白之胺基酸序列，將本研究所得之 CarMV 分離株與 GenBank 上已登錄之海芋及康乃馨分離株進行類緣關係分析 (phylogenetic analysis) (如表一所列) 。所有序列先以 CLUSTAL X version 1.8[26] 彙整分析後，再利用 PAUP 4.0[25] 程式進行 NJ (The neighbor-joining) 結合 BRM 法 (The bootstrap resampling method)[14] 做類緣關係之分析。其中 Bootstrap values 乃由逢機重複一千次的取樣所計算之結果，所得之類緣演化樹以 Tree view[22] 程式顯示。

結 果

接種試驗結果

呈現黃斑之海芋組織粗汁液接種於奎藜，並無單斑形成，且接種於其他測試作物亦無病徵表現及無病毒反應。康乃馨病組織之粗汁液接種於奎藜及紅藜，7天後於接種葉上有單斑形成；接種於番杏，則在七天後於接種葉呈現黃化，以 CarMV 抗血清進行 ELISA 檢測接種葉及新生葉的病毒反應顯示，在番杏上爲非系統性感染。接種於菸草，七天後呈現黃化病徵。以康乃馨接種奎藜產生之單斑爲接種源，接種於 Black Magic 品種之健康海芋，接種後 3 週及 5 週植株外觀並無明顯病徵，然而以 ELISA 檢測之結果顯示有病毒感染之反應。

表一、感染海芋及康乃馨之康乃馨斑駁病毒 (CarMV) 分離株與已登錄 GenBank 之 CarMV 鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列相同度之比對

Table 1. Percent identities of the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein region of *Carnation mottle virus* (CarMV) isolated from calla lily and carnation comparing to those corresponding sequences available in GenBank

Virus isolates[1]	Percent identity of CP sequence[2]	
Acc. No	nt	aa
P04383	100.0	100.0
AY383566	97.9	99.1
EF622206[2]	98.0	98.9
EF622207	96.4	98.0
EF622208	96.7	99.1
EF622209	96.7	98.9
EF622210	98.0	98.0
EF622211	98.4	98.6
AJ844552	96.6	98.0
AJ811998	97.5	98.6
AJ549954	98.1	97.7
AF192772	99.0	98.0
NC_001265	96.6	98.0
AJ489479	96.4	98.0
AF173879	98.9	99.1
DQ092485	98.1	98.6

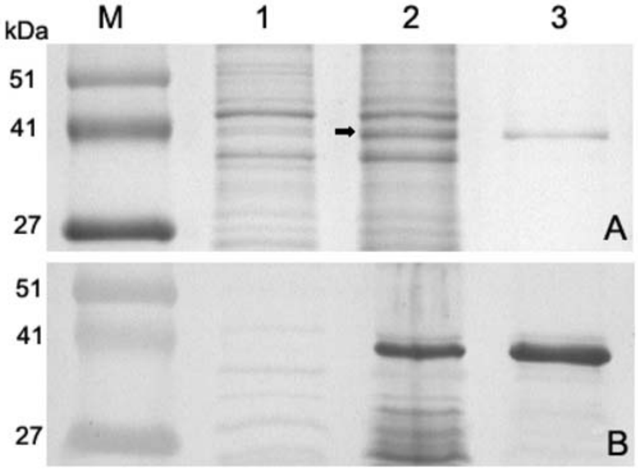
1. The sequences in the regions of coat proteins of different CarMV isolates in this study were registered in GenBank with accession numbers including EF622206 (calla lily isolate Fo25), EF622207, EF622208 and EF622209 (carnation isolates from Italy), and EF622210 and EF622211 (carnation isolates from the Netherland). The isolate TW (AY383566)[(10)] is from calla lily.
2. Each virus isolate was compared with the CarMV (Acc. No. P04383); nt, nucleotide sequence; aa, amino acid sequence.

感染海芋之 CarMV-Fo25 鞘蛋白基因選殖及核酸序列分析

由進口自紐西蘭之海芋葉片黃斑組織，萃取其全量 RNA 經 RT-PCR 反應後，於電泳分析中確定可得到一預估値約 1 kb 左右之核酸片段，此核酸片段經選殖後之序列分析結果顯示，本研究分離自海芋之 Fo25 病毒核酸分離株與 GenBank 上已登錄感染康乃馨之 CarMV 在病毒鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列之相同度均高於 96% 以上 (表一)，顯示其爲 CarMV 之分離株。CarMV-Fo25 於 GenBank 之登錄序號爲 EF22206。

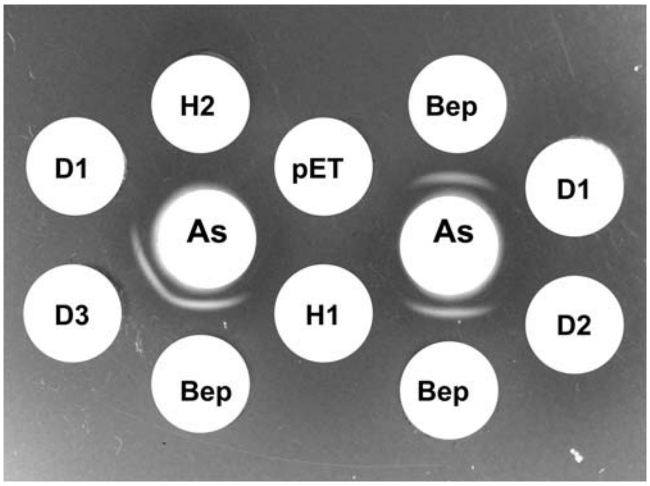
CarMV-Fo25 鞘蛋白之表現及其抗血清製備

CarMV 鞘蛋白序列構築於 pET28b (+) 載體後，轉型於 *E. coli* strain Rosetta (DE3) 宿主中，經 IPTG 誘導後表現之蛋白質大小約 39 kDa，與預估値相符 (圖一) 。以西方轉漬法分析，此表現蛋白可與購自 Agdia 之 CarMV 抗血清有專一性反應 (圖一) 。此表現蛋白經兔



圖一、經由細菌大量表現之 CarMV-Fo25 鞘蛋白電泳及西方轉漬法分析圖。(A) SDS-PAGE蛋白質電泳圖; (B)西方轉漬法分析。

Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assay of the bacterial expressed coat protein (CP) of *Carnation mottle virus* isolate Fo25 (CarMV- Fo25). (A) SDS-PAGE of the 39-kDa bacterial expressed recombinant CarMV-Fo25 CP (arrowed); (B) The bacterial expressed CarMV-Fo25 CP was reacted with the 200x-diluted antiserum against CarMV purchased from Agdia Co.. Lane M, protein markers; lane 1, IPTG-induced bacteria lysate containing expression vector pET28b (+) without CarMV-Fo25 CP insert; lane 2, IPTG-induced bacteria lysate containing pET28b (+) with CarMV-Fo25 CP insert; lane 3, purified bacterial expressed recombinant CarMV-Fo25 CP.



圖二、應用本研究所製備對應海芋 CarMV-Fo25 分離株之細菌表現鞘蛋白抗血清於 SDS 免疫擴散法與罹病海芋及康乃馨之反應。

Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-immunodiffusion test of the antiserum (Fo25) against bacterial expressed coat protein (CP) of *Carnation mottle virus* isolate Fo25 from calla lily. The central well was filled with antiserum against antiserum Fo25 (As). The peripheral wells were filled with SDS-treated antigens including Bep, the IPTG-induced bacterial lysate containing pET28b (+) with CarMV-Fo25 CP insert; pET, the IPTG-induced bacteria lysate containing pET28b (+) without CarMV-Fo25 CP insert; D1 and D2, CarMV-infected calla lily tissues; D3, CarMV-infected carnation tissue; H1 and H2 are healthy tissues of calla lily and carnation, respectively.

免疫注射後所製備之 CarMV-Fo25 抗血清於 SDS- 免疫擴散反應可與正對照之 CarMV 表現蛋白及經 IPTG 誘導之 pET28b 蛋白質反應，與海芋 CarMV 罹病組織無反應；然而此抗血清可與康乃馨罹病組織產生沉澱反應，且與 CarMV-Fo25 表現蛋白所產生之沉澱反應呈現同源性之融合反應 (圖二)。

應用 CarMV-Fo25 抗血清於檢測田間樣品之測試

本試驗總共以 ELISA 檢測 15 個康乃馨及 8 個海芋進口種苗與種球樣品，結果顯示自製之 CarMV-Fo25 抗血清可穩定偵測出感染 CarMV 之海芋及康乃馨樣品，而對照購自 Agdia 之 CarMV 抗血清在本次實驗中僅能偵測到康乃馨而無法偵測出海芋樣品之感染 (表二)。而且所有正反應之樣品以 Fo25 抗血清所測得之反應值均明顯高於對照Agdia抗血清之數值 (表二)，顯示本研究自製之 Fo25 抗血清有極佳之反應性 (reactivity)。由ELISA試驗中發現檢測康乃馨樣品之反應數值明顯高於海芋樣品，顯示康乃馨組織內所累積之CarMV 濃度極高，而相對海芋組織內則濃度偏低。

表二、應用本研究所製備之 Fo25 抗血清於 ELISA 檢測田間康乃馨及海芋樣品感染康乃馨斑駁病毒之效果測試

Table 2. ELISA test using antiserum against Fo25 prepared in this study to detect *Carnation mottle virus* (CarMV) infection in field collected samples of carnations and calla lilies [1]

Field samples	Antiserum	
Carnations	Fo25	Agdia
Italy-1	3.68	0.32
Italy -2	3.74	0.36
Italy -3	3.78	0.36
Italy -4	3.78	0.47
Italy -5	3.78	0.38
Italy -6	3.72	0.37
Italy -7	3.78	0.59
Netherland-1	2.40	0.29
Netherland-2	2.38	0.22
Netherland-3	2.47	0.40
Netherland-4	0.28	0.18
Netherland-5	0.24	0.20
Netherland-6	1.72	0.20
Netherland-7	1.32	0.23
Netherland-8	0.16	0.22
Calla lilies		
New Zealand-1	0.38	0.09
New Zealand-2	0.78	0.22
New Zealand-3	0.28	0.27
New Zealand-4	0.34	0.27
New Zealand-5	0.57	0.18
New Zealand-6	0.33	0.16
New Zealand-7	0.41	0.21
New Zealand-8	0.43	0.15
Diseased control	3.62	0.60
Healthy control threshold	0.20	0.33

[1.] ELISA procedure as described in the text was followed. Dilution of purified Immunoglobulin G (1 mg/ml) of Fo25 antiserum in the factor of 1/1000 was used. Antiserum to CarMV purchased from Agdia Co. was used with the same dilution factor as control for comparison.

此外，二個抗血清應用於西方轉漬法之比較試驗中，顯示 Fo25 抗血清可偵測到康乃馨及海芋組織內之 CarMV 鞘蛋白，而對照 Agdia 抗體則只能偵測到感染 CarMV 之康乃馨樣品。而且相較之下，前者對於健康對照之非專一性反應明顯低於後者 (圖三)，顯示本研究製備之Fo25 抗血清具有極佳之專一性 (specificity) 。

感染康乃馨之 CarMV 分離株鞘蛋白核酸序列分析

本研究利用自製的 Fo25 抗血清可偵測到許多進口之康乃馨幼苗受到 CarMV 之感染。因此將該等感染樣品進一步進行核酸分子選殖與定序，共獲得 5 個

CarMV 鞘蛋白的分子選殖株，並已登錄於 GenBank 上，取得序號分別爲義大利分離株 EF622207、EF622208、和 EF622209，以及荷蘭分離株 EF622210 及 EF622211 (表一)。此五個分離株與其他研究已登錄之 CarMV，於鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列之相同度均高於 96% (表一)。

CarMV 不同分離株之類緣演化分析

由本研究所得之 CarMV 海芋及康乃馨分離株，與 GenBank 上其他的 CarMV 進行類緣演化關係分析，由樹狀圖發現，海芋之分離株雖同屬於 CarMV 分群，但是與康乃馨分離株有類緣上之分別差異，海芋分離株形成個別的分群 (圖四)，顯見 CarMV 的類緣演化關係依寄主來源不同而有形成個別的分群現象 (圖四)。其中同屬於海芋的分離株，在現有的兩個分離株比較之下，也有遺傳演化的差異性，各自形成一類緣系統 (圖四)。

討　論

CarMV 爲康乃馨上常見之病毒，且廣泛分佈，此病毒可感染彩色海芋乃首次於國內北斗發現[10]。本研究由海芋進口種球上，利用 RT-PCR 方法從感染 CarMV 的植株葉片直接進行病毒核酸之增幅並進而選殖其全長度鞘蛋白，由分子生物層次之證據再次印證了 CarMV 可感染彩色海芋。後續經由細菌生體內大量表現 CarMV 鞘蛋白作爲抗原製備對應此病毒之抗血清，結果也顯示製備出之病毒抗血清可同時有效地應用於海芋及康乃馨的血清法檢測，在反應性 (reactivity) 及專一性 (specificity) 的檢測效果上均優於 Agdia 公司出品的 CarMV 抗血清，因此此病毒抗血清未來除供國內對於本病毒檢測之需外，也深具國際商品之競爭性。

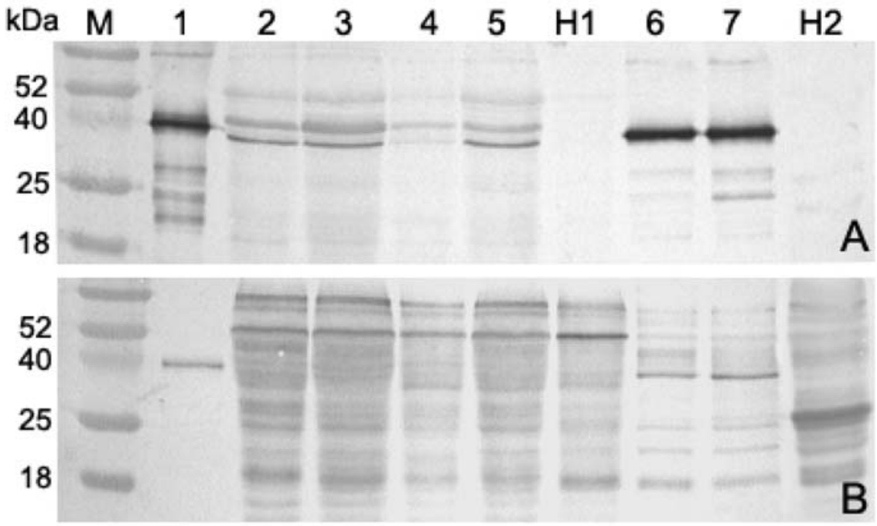
本研究之 CarMV-Fo25 乃由進口海芋種球 (Fandango 品種) 所初次抽生之葉片上出現黃色斑點病徵之葉片，經由 RT-PCR 及核酸選殖而得之分離株，研究初期利用 Agdia 公司出品的 CarMV 抗血清檢測，ELISA 讀值雖顯示爲正反應，但僅略高於健康對照組之判讀值。後續將本研究自製之 CarMV-Fo25 抗血清進行檢測進口海芋與康乃馨種苗之效果，CarMV-Fo25 抗血清可測得海芋之 CarMV，然而正反應讀值均低於 1.0，而由康乃馨樣品測得正反應讀值均高於 1.0，顯示康乃馨組織內所累積之 CarMV 濃度極高，而相對海芋組織內則濃度偏低 (表二)。此一推論事實上在後續的西方轉漬試驗中獲得證實 (圖三)，同時也說明前項免疫擴散試驗中爲何 Fo25 抗血清無法與海芋感病組織反應之理由。

本研究雖然可由海芋葉片直接檢測並選殖出 CarMV 之核酸片段，然而後續之接種試驗顯示感染彩色海芋之 CarMV 無法於本研究中以機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 或紅藜 (*C. amaranticolor*) 等作物上形成單斑，此與陳氏等人[10] 報告之 CarMV-TW 分離株可感染奎藜引起單斑有所不同。推測原因，可能是病毒濃度偏低所致，也可能是分離株的差異，此可由類緣分析之結果顯示同屬於感染海芋的 CarMV 分離株 Fo25 及 TW，在遺傳演化上各自形成一系統 (圖四)，由此差異性可見端倪，然而此推論仍須有更多不同的分離株進行比較分析，才能更加確認。

來自康乃馨之 CarMV 分離株則容易在奎藜、紅藜等作物上接種出單斑，取單斑爲接種源回接海芋 Black Magic 品系，植株外觀並無明顯病徵，但可由 ELISA 血清法檢測出確實有 CarMV 之感染。根據陳氏等人研究，海芋 CarMV 分離株可感染野莧、日日春、百日草、洋桔梗、石竹，以及辣椒、甜椒、番茄及菸草。而文獻上報告 CarMV 病毒寄主範圍廣[15]，本研究由康乃馨上分離所得之 CarMV 確實可感染海芋，雖然目前尚無研究報告顯示 CarMV 可經由蟲媒傳播，然而透過人爲操作方式在不同寄主間產生交叉感染是有可能發生的，此點仍需關注。

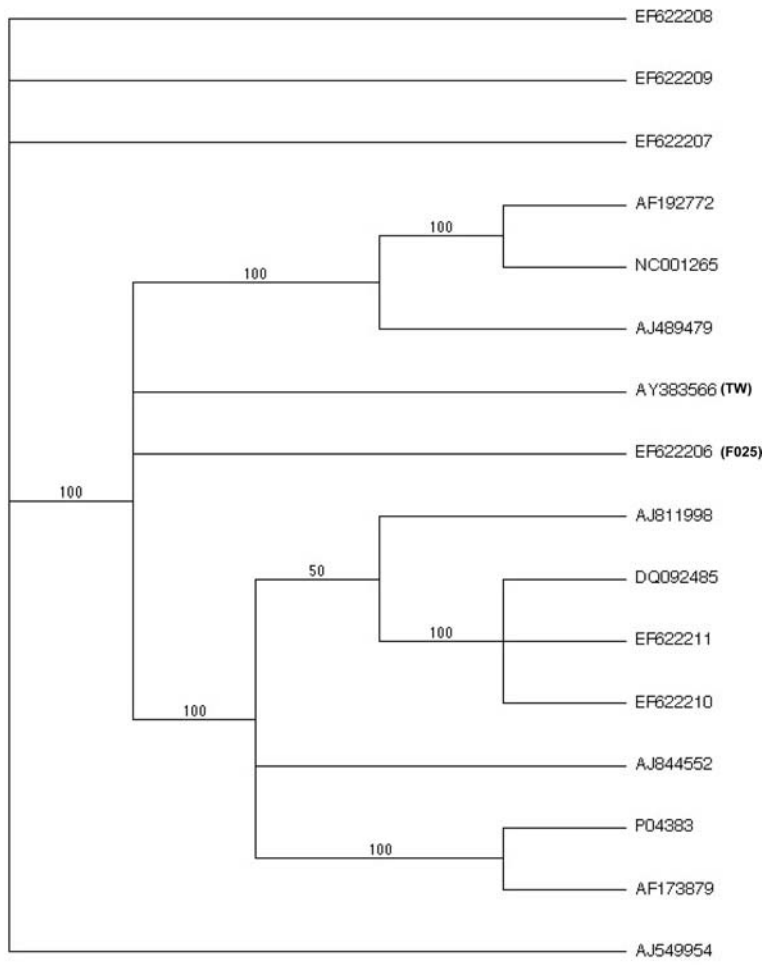
對應病毒鞘蛋白之氨基酸序列之類緣演化分析結果顯示，分離自不同寄主之 CarMV，即使其序列之相同度均達到 97% 以上，但是在類緣分析上呈現分群現象，此意味著 CarMV 可能爲了適應寄主植物而在基因層次發生演化而改變，此種現象也普遍發生在不同的植物病毒上[2, 27]。

民國 94 至 95 年間，應用本研究開發之 CarMV-Fo25 抗血清於國外進口海芋組培苗之血清檢測，檢測樣品共 729 件，檢出 CarMV 罹病共 56 件，其檢出率約爲 7.7%，罹病樣品之 ELISA 吸光值平均爲 0.31；同期間，調查國內后里海芋種植地區之 CarMV 感染情形，檢測樣品共 315 件，檢出 CarMV 罹病共 50 件，其檢出率約爲 15.9%，罹病樣品之 ELISA 吸光值平均爲 0.33。此等結果顯示海芋縱使感染 CarMV 其病毒濃度均偏低，且調查也發現檢測正反應之海芋樣品其葉片大多不呈現病徵，顯示 CarMV 對海芋生育之影響可能不明顯，此部分有待持續的觀察才能確定。目前 CarMV 在海芋上被檢出之比率在 7-16% 左右，不獨國內生產之種苗已有發生，連本次所調查之國外種苗也有此病毒感染之現象。其分佈雖然尚稱有限，不過由於此病毒的高度傳染特性，建議在防疫上仍須予以適當的關注。



圖三、應用本研究所製備對應海芋 CarMV-Fo25 分離株之細菌表現鞘蛋白抗血清於西方轉漬法檢測田間海芋及康乃馨樣品感染CarMV 之效果測試。

Fig. 3. Western blotting test of antiserum against bacterial expressed coat protein of *Carnation mottle virus* Fo25 isolate (CarMV-Fo25) for the detection of CarMV in field collected samples of carnation and calla lilies. Samples were reacted to the 1000x-diluted antiserum to CarMV-Fo25 (A) and to the 200x-diluted antiserum to CarMV purchased from Agdia Co (B). Lane M, protein marker; lane 1, the purified lysate of bacteria expressed CarMV-Fo25 CP; lane 2-5, CarMV-infected calla lily tissues; lane H1, healthy tissue of calla lily; lane 6-7, CarMV-infected carnation tissues; lane H2, healthy tissue of carnation.



圖四、不同康乃馨斑駁病毒分離株之類緣演化分析

Fig. 4. A phylogram derived from the analysis of genetic distances based on the amino acid sequences of the coat proteins of *Carnation mottle virus* (CarMV). The tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) algorithm with the bootstrap resampling method (1000 random resamplings), using PAUP 4.0. Numbers at each node indicate the percentages of bootstrap samples (only values ≧50 are shown). Horizontal branch length is drawn according to the scale bar indicating 5 substitutions per 1000 amino acid positions. The sequences in the regions of coat proteins of different CarMV isolates in this study were field in GenBank and assigned the accession numbers including calla lily isolate Fo25 (EF622206), carnation isolates from Italy (EF622207, EF622208 and EF622209), and Netherland (EF622210 and EF622211), respectively. The isolate TW (AY383566) [10] is from calla lily available in GenBank.

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Chen, C. C., Chang, C. A., and Dai, T. 1999. Variable distribution patterns of bean yellow mosaic potyvirus and cucumber mosaic cucumoviruses in gladiolus plant and their influence on virus detection. Plant Pathol. Bull. 8: 117-120. (in Chinese with English abstract)
2. Chen, C. C., Chang, C. A., and Yeh, S. D. 2006. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Turnip mosaic virus* collected from calla lily. Plant Pathol. Bull. 15: 1-8.
3. Chen, C. C., Chao, C. H., Chen, C. C., Yeh, S. D.. Tsai, H. T., and Chang. C. A. 2003. Identification of *Turnip mosaic virus* isolates causing yellow stripe and spot on calla lily. Plant Dis. 87: 901-905.
4. Chen, C. C., Chen, T. C., Lin, Y. H., and Yeh, S. D. 2005. A chlorotic spot disease on calla lilies (*Zantedeschia* spp.) is caused by a tospovirus serologically but distantly related to *Watermelon silver mottle virus*. Plant Dis. 89: 440-445.
5. Chen, C.C., Hsiang, T., Chiang, F. L., and Chang, C. A. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 13-20.
6. Chen, C. C., Hsu, H. T., Cheng, Y. H., Huang, C. H., Liao, J. Y., Tsai, H. T., and Chang, C. A. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. Botanical Studies. 47: 369-378.
7. Chen, C. C., Hsu, H. T., Chiang, F. L., and Chang, C. A. 2006. Serological and molecular properties of five potyviruses infecting calla lily. Acta Horticul. 722: 259-270.
8. Chen, C. C., Huang C. H., Chen, T. C., Yeh, S. D., Cheng, Y. H., Hsu, H. T., and Chang C. A. 2007. First report of *Capsicum chlorosis virus* causing yellowing stripes on calla lilies. Plant Dis. 91:1201.
9. Chen, Y. K., Jan F. J., Chen, C. C., and Hsu, H. T. 2006. A new natural host of *Lisianthus necrosis virus* in Taiwan. Plant Dis. 90:1112.
10. Chen, C. C., Ko, W. F., Lin, C. Y., Jan, F. J., and Hsu, H. T. 2003. First report of *Carnation mottle virus* in calla lily (*Zantedeschia* spp.). Plant Dis. 87: 1593.
11. Chen,C. C., Lin, C. Y., Ko, W. F., and Jan, F. J. 2003. Isolation and characterization of Carnation mottle virus from carnation. Plant Pathol. Bull. 12: 199-208. (in Chinese with English abstract)
12. Chang, C. A., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyvirus. Phytopathology 78: 1266-1275.
13. Chen, C. C., Tsai, H.T., Chiang, F. L., and Chang, C. A. 2003. Serological and molecular characterizations of T17Q isolate of *Zantedeschia mild mosaic virus* infecting calla lily. Plant Pathol. Bull. 12: 290. (in Chinese abstract)
14. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
15. Hollings, M., and Store, O. M. 1970. Carnation mottle virus. CMI/AAB. Description of plant viruses No. 7.
16. Hu, W. C. 2001. Molecular characterization of *Dasheen mosaic virus* and *Konjak mosaic virus* infecting calla lily in Taiwan. Master thesis 72 pp. National Taiwan University Graduate Institute of Plant Pathology.
17. Huang, C. H., and Chang, Y. C. 2005. Identification and molecular characterization of *Zantedeschia mild mosaic virus*, a new calla lily-infecting potyvirus. Arch Virol. 150: 1221-1230.
18. Kuehny, J. S., 2000. Crop reports: Calla history and culture. HortTechnology 10: 267-274.
19. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature 227: 680-685.
20. Li, R. H., Zettler, F. W., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1998. The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of dasheen mosaic virus (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch. Virol. 143: 2461-2469.
21. Liu, M. C., Yang, T. C., Liao, Y. J., Shiau, F. L., Ho. Y. H., and Chen, J. J. 2004. Introduction and establishment of micropropagation and tuber production system for calla lily in Taiwan. Pages 2-7 *in*: Handbook of Calla lily Protection. Chen, C. F., Wang, P. J., and Chen, C. C. eds. Bureau of Animal and Plant Health inspection and Quarantine Councial of Agriculture. 94 pp. (in Chinese)
22. Page, R. D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computer. Comput. Appli. Biosci. 12: 357-358.
23. Pham, K., Langeveld, S. A., Lemmers, M. E. C., and Derks, A. F. L. M. 2002. Detection and identification of potyviruses in *Zantedeschia*. Acta. Hortic. 568: 143-148.
24. Purcifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 788. 39 pp.
25. Swofford, D. L. 1998. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4. Sunderland, MA. USA, Sinauer Associates.

26. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexibel strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25: 4876-4882.
27. Tomimura, K., Gibbs, A. J., Jenner, C. E., Walsh, J. A., and Ohshima, K. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia. Mol. Ecol. 12: 2099-2111.
28. Zettler, F. W., and Hartman, R. D. 1987. Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. Plant Dis. 71: 958-963.
29. Zettler, F. W., and Hartman, R. D. 1995. Virus diseases of major ornamental crops-*Dieffenbachia*, *Caladium*, and *Zantedeschia*. p. 464-470, In: Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops. Edited by Loebenstein, G., Lawson, R. H., and Brunt, A. A., John Wiley & Sons Inc., UK. 543 pp.

ABSTRACT

Chen, C. C.[1], Huang, C. H.[1], Cheng, Y. H.[1], Chiang, F. L.[1], Chen, L. W.[1], and Chang, C. A.[2,3] 2009. Preparation of polyclonal antiserum against *Carnation mottle virus* by immunizing bacterial expressed viral coat protein and its application on virus detection. Plant Pathol. Bull. 18: 35-44.
([1] Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung; [2] Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung; [3] Corresponding author, E-mail: cachang@cyut.edu.tw; Fax: +886-4-23331089)

Calla lily (*Zantedeschia* spp.) is an emerging floral crop in Taiwan and considered with high economic potential. In this study, some calla lily plants bearing with chlorotic spots on the newest leaves coming from the bulbs imported from New Zealand were frequently observed. The symptom was quite similar to that caused by *Carnation mottle virus* (CarMV) reported by Chen *et al*., (2003). By the use of degenerate primers flanking complete coat protein (CP) gene of CarMV, a predicted 1.0 kb DNA was consistently amplified from the calla lily plants exhibiting chlorotic spots. An isolate (Fo25) was cloned and sequenced from the RT-PCR amplicons and compared to those CarMV corresponding sequences available in the GenBank. The percentage identities of CP gene of Fo25 in the sequences of nucleotide and amino acid were both higher than 96% comparing to those of CarMV, indicating that Fo25 isolate is a strain of CarMV. Full-length of CarMV's CP gene was subsequently amplified and constructed into the expression vector pET28b(+), and transformed into *E. coli* Rosetta (DE3). An over expressed protein with an expected molecular mass of 39-kDa was further purified and used as immunogen to prepare polyclonal antiserum. The produced antiserum (Fo25) was tested and found to be applicable in ELISA, western blotting and SDS-immunodiffusion tests for the detection of CarMV in field samples of calla lily and carnation. In these serological tests the reactivity and specificity of antiserum against Fo25 are found significantly better than the control antiserum purchased from Agdia Co.. Sequences of CP gene obtained from five CarMV isolates from carnations and two from calla lilies were used to study their phylogenetic relationship. Genetic analysis of the amino acid sequences of CP gene revealed that there was possibly genetic clusters among different CarMV isolates infecting different hosts.

Key words: carnation, calla lily, *Carnation mottle virus*, virus detection, bacteria expressed coat protein